

УДК 581.1

## **ИНДУЦИРОВАНИЕ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ ДЕЙСТВИЕМ ДОНОРА ОКСИДА АЗОТА: СВЯЗЬ NO С ДРУГИМИ СИГНАЛЬНЫМИ МЕССЕНДЖЕРАМИ**

**© 2010 г. Ю. В. Карпец, Ю. Е. Колупаев, Т. О. Ястреб,  
Г. Е. Акинина, В. Н. Попов, Н. В. Швиденко,  
А. А. Вайнер, Г. П. Коц, А. И. Обозный**

*Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева  
(Харьков, Украина)*

Изучали влияние донора оксида азота нитропруссид натрия (НПН) на устойчивость колеоптилей пшеницы к повреждающему нагреву (10 мин воздействие температуры 43°C). Обработка колеоптилей НПН приводила к значительному усилению генерации ими супероксидного анион-радикала, вызывала тенденцию к снижению в них содержания пероксида водорода и увеличению количества продуктов пероксидного окисления липидов. Воздействие донора оксида азота в концентрации 0,5 мМ, индуцируя эффект окислительного стресса, в то же время не вызывало фрагментации ДНК и признаков потери целостности мембран, определяемой по окрашиванию Эвансом голубым. При этом обработка колеоптилей пшеницы НПН в концентрациях 0,1-2 мМ приводила к повышению их устойчивости к гипертермии. Скавенжер оксида азота метиленовый синий, антиоксидант ионол, блокатор кальциевых каналов хлорид лантана и антагонист кальмодулина хлорпромазин в значительной степени уменьшали усиление генерации супероксида, индуцируемое обработкой колеоптилей НПН. При этом все названные модификаторы снижали эффект повышения теплоустойчивости колеоптилей пшеницы, вызываемый действием донора оксида азота. Сделано заключение о том, что индуцирование теплоустойчивости колеоптилей при действии экзогенного NO происходило при посредничестве активных форм кислорода и ионов кальция как внутриклеточных мессенджеров.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum L.*, оксид азота (NO), активные формы кислорода, кальций, теплоустойчивость

Монооксид азота (NO) является одним из важных участников сигнальной трансдукции и регуляторов физиологических процессов в растительных и животных клетках. Показано, что NO принимает участие в регуляции клеточного цикла растительной клетки (Wilson et al., 2008), процессов дифференциации и морфогенеза растений (Simpson, 2005; Емец и др., 2009), формировании симбиотических отношений бобовых с ризобиями (Глянько, Васильева, 2007).

Установлено, что оксид азота задействован как в трансдукции сигналов, стимулирующих синтез ряда фитогормонов, так и в передаче самих гормональных сигналов (Xing et al., 2004; Lu et al., 2005; Tewari et al., 2008; Wilson et al., 2008).

Накапливается все больше данных об участии оксида азота в стрессовых реакциях растений. Весьма подробно исследована его роль в активации защитных реакций в ответ на заражение патогенами (Neill et al., 2008). Ныне изучается значение оксида азота в формировании устойчивости растений к действию абиотических стрессоров. Так, показано увеличение продуцирования оксида азота клетками листьев табака в ответ на гипертермию, осмотический

---

*Адрес для корреспонденции:* Карпец Юрий Викторович, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, п/о «Коммунист-1», Харьков, 62483, Украина;  
e-mail: plant\_biology@mail.ru

## ИНДУЦИРОВАНИЕ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ

стресс и действие соли (Cevahir et al., 2007). На растениях арабидопсиса с использованием дикого типа и мутанта, дефицитного по активности NO-синтазы, продемонстрирована прямая зависимость между содержанием монооксида азота и солеустойчивостью (Zhao et al., 2007).

В ряде работ сообщается о положительном действии экзогенных доноров оксида азота на устойчивость растений к абиотическим стрессорам. Так, обработка проростков пшеницы нитропруссидом натрия активировала их рост при засухе, облучении ультрафиолетом Б и комбинировании этих стресс-факторов (Тян, Лей, 2007). Доноры NO также повышали тепло- и солеустойчивость проростков риса (Uchida et al., 2002), резистентность к засолению молодых растений кукурузы (Zhang et al., 2006). Защитные эффекты оксида азота при действии стрессоров связывают с активацией с его участием антиоксидантных систем, синтеза осмолитов и стрессовых белков (Uchida et al., 2002; Тянь, Лей, 2007; Zhang et al., 2009).

Особый интерес представляет выяснение связи оксида азота с другими сигнальными интермедиатами при формировании адаптивных реакций растений. Есть основания полагать, что многие эффекты NO реализуются во взаимодействии с активными формами кислорода (АФК). Такие эффекты в большей степени изучались на примере реакций растений на заражение патогенными бактериями (Delledonne et al., 2001). Хотя в последние годы появляются сведения и о роли таких взаимодействий между сигнальными интермедиатами и при формировании реакций растений на абиотические стрессоры. Так, на растениях *Hypericum perforatum* показано, что тепловой шок индуцировал накопление вторичного метаболита гиперина, этот эффект зависел от синергетического взаимодействия NO и пероксида водорода (Xu et al., 2008). В культуре тканей корней женьшеня донор NO вызывал активацию НАДФН-оксидазы и усиление генерации супероксидного анион-радикала (Tewari et al., 2008). В то же время показано, что эффект экзогенного оксида азота как агента, вызывающего закрытие устьиц, не подавлялся каталазой и реализовался независимо от АФК (Lu et al., 2005).

В работе Zhang et al. (2009) установлено, что экзогенный оксид азота подавлял вызываемое действием ультрафиолета накопление пероксида водорода мутантами арабидопсиса, дефицитными по NO-синтазе, и вызывал по-

вышение в них активности антиоксидантных ферментов. Подавление накопления пероксида водорода донорами оксида азота при действии стрессоров показано и другими исследователями (Jih et al., 2003; Бояршинов и др., 2008). Установлено, что NO может не только индуцировать повышение активности антиоксидантных ферментов, но и действовать непосредственно как антиоксидант, нейтрализующий избыток пероксида водорода и других активных форм кислорода (Lamotte et al., 2004; Cevahir et al., 2007).

Эффекты оксида азота реализуются в тесной связи с кальцием как универсальным внутриклеточным мессенджером. Так, установлено, что индуцирование оксидом азота накопления белков, связанных с патогенезом, у растений табака происходило при посредничестве каскада  $NO \rightarrow$  циклическая АДФ-рибоза  $\rightarrow Ca^{2+}$  (Klessig et al., 2000). Ключевыми процессами этого каскада являются вызываемое оксидом азота повышение активности гуанилатциклазы, накопление цГМФ, активация им АДФ-рибозилциклазы, увеличение содержания цАДФ-рибозы, открывающей кальциевые каналы. Повышение концентрации цитозольного кальция приводит к активации различных типов протеинкиназ, что вызывает фосфорилирование ряда транскрипт-факторов и усиление экспрессии определенных генов. Показано участие оксида азота в увеличении концентрации цитозольного кальция у растений при действии патогенных элиситоров и водного стресса (Gould et al., 2003; Lamotte et al., 2004; Vandelle et al., 2006). С другой стороны, установлено, что активация осмотическим стрессом и донором оксида азота протеинкиназы с мол. массой 42 кД у растений табака происходила без участия притока цитозольного кальция, хотя эта протеинкиназа, предположительно, может влиять на состояние белков кальциевых каналов (Lamotte et al., 2006). В ряде работ обсуждается возможность прямого (без участия кальция) воздействия оксида азота на протеинкиназы (см. обзор: Courtois et al., 2008).

В целом, взаимодействие оксида азота с другими внутриклеточными мессенджерами при формировании адаптивных реакций растений остается мало изученным. Целью настоящей работы явилось исследование влияния донора оксида азота на теплоустойчивость отрезков колеоптилей пшеницы и выяснение возможной роли АФК и ионов кальция как посредников в реализации эффектов экзогенного NO.

## МЕТОДИКА

Объектом исследования были отрезки колеоптилей (базальные части), отделенные от четырехсуточных этиолированных проростков пшеницы мягкой озимой (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия. Подготовка растительного материала описана нами ранее (Колупаев и др., 2005). Отпрепарированные колеоптили в течение 2-3 ч выдерживали в дистиллированной воде, затем 16-18 ч на 2% растворе сахарозы. После такой предынкубации, необходимой для полного снятия эффектов раневого стресса, в среду инкубации колеоптилей опытных вариантов вводили соответствующие эффекторы.

В качестве донора оксида азота использовали нитропруссид натрия (НПН) в различных концентрациях (см. ниже). В отдельных сериях экспериментов колеоптили обрабатывали скавенджером NO метиленовым синим (5 мкМ), антиоксидантом ионолом (бутилгидрокситолуол, 5 мкМ), неспецифическим блокатором кальциевых каналов хлоридом лантана (400 мкМ) либо антагонистом кальмодулина хлорпромазином (5 мкМ). Концентрации этих соединений выбирали на основании предварительных опытов. В вариантах с комбинированной обработкой данные эффекторы добавляли в основную среду инкубации колеоптилей (2% сахароза) за 1 ч до введения в нее НПН. Колеоптили контрольных вариантов инкубировали в 2% сахарозе.

После 24-25 ч инкубации колеоптилей на растворах исследуемых эффекторов часть отрезков каждого варианта подвергали потенциально летальному нагреву в водном термостате при температуре 43°C в течение 10 мин. Далее отрезки всех вариантов продолжали инкубировать на 2% сахарозе. Через 3 сут после нагрева оценивали повреждения колеоптилей по появлению специфического оттенка и потере тургора (Мелехов и др., 1983). В это же время оценивали состояние колеоптилей, которые не подвергались нагреву.

В определенные временные отрезки оценивали генерацию колеоптилями супероксидного анион-радикала, содержание в них пероксидов и продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) – 2-тиобарбитуровой кислоты активных продуктов (ТБК-активных продуктов).

Генерацию супероксидных анион-радикалов интактными отрезками колеоптилей во внешний раствор определяли по восстановлению нитротетразолия синего (Шорнинг и др.,

2000). По 15 колеоптилей помещали в пробирки с 5 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,6), содержащего 0,05% нитротетразолия синего, 10 мкМ ЭДТА, 0,1% тритона X-100. Пробы инкубировали на шейкере (120 об/мин) в течение 1 ч, после чего определяли оптическую плотность инкубационного раствора при длине волны 530 нм. Для проверки специфичности генерации  $O_2^{\cdot-}$  в специальных опытах в пробы добавляли СОД (50 ед./мл). СОД ингибировала генерацию супероксидного анион-радикала не менее чем на 90%. В связи с этим считали, что количество восстановленного нитротетразолия синего определяется количеством  $O_2^{\cdot-}$  (Шорнинг и др., 2000).

Содержание пероксидов оценивали ферротрицианидным методом, экстрагируя их из растертых на холоде колеоптилей 5%-ной ТХУ (Sagisaka, 1976). При таком способе экстракции из тканей извлекается в основном  $H_2O_2$ , на который приходится приблизительно 90% пероксидов, переходящих в раствор (Sagisaka, 1976).

Содержание ТБК-активных продуктов оценивали по методике, описанной Мерзляком и соавт. (1978), используя для анализа гомогенат, приготовленный на 0,1 М Трис-НСl буфере (pH 7,6).

Для выделения ДНК отрезки колеоптилей растирали в 0,5 мл лизирующего раствора, содержащего 1,4 М NaCl, 20 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис-НСl (pH 8,0), 2% СТАВ (cetyl triethylammonium bromide) (Doyle, Doyle, 1987), добавляли равный объем смеси хлороформа и изопентанола (24:1), перемешивали и центрифугировали 10 мин в микроцентрифуге Eppendorf 5415 при 14000 об/мин, отбирали верхнюю водную фазу, смешивали ее с равным объемом изопропанола и осаждали ДНК центрифугированием в том же режиме. Полученный осадок промывали 1 мл 70% этанола и повторно центрифугировали 3 мин при 14000 об/мин, сливали спирт, растворяли ДНК в 200 мкл воды milliQ. Образцы ДНК обрабатывали РНКазой (50 мкг/мл) в течение 1 ч при 37°C, и ДНК вновь осаждали этанолом (Замятина и др., 2003).

Одинаковые порции препаратов ДНК подвергали электрофорезу в агарозном геле при постоянном напряжении 100 V в 0,09 М Трис-боратном буфере (pH 8,3), содержащем 0,5 мкг бромистого этидия (Замятина и др., 2003).

Состояние мембран колеоптилей оценивали по окрашиванию клеток красителем Эвансом голубым (Kawai, Uchimiya, 2000; Delle-

donne et al., 2001) с некоторыми модификациями. Эванс голубой окрашивает только клетки с поврежденными мембранами. Отрезки колеоптилей помещали на 2 ч в 0,1% водный раствор Эванса голубого, после чего в течение 10 мин отмывали их дистиллированной водой и оценивали степень окрашивания.

Опыты проводили в 4-6-кратной биологической повторности. Эксперименты воспроизводили независимо не менее трех раз. На графических рисунках приведены средние результаты и их стандартные отклонения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В первой серии опытов оценивали влияние различных концентраций донора оксида азота НПН на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы, определяемую по их выживанию после 10-минутного нагрева при температуре 43°C. Обработка колеоптилей НПН в широком диапазоне концентраций заметно увеличивала процент их выживания после нагрева (рис. 1). Наиболее эффективной была концентрация 0,5 мМ, которую и использовали в большей части дальнейших экспериментов. Концентрация донора NO 5 мМ существенно усиливала тепловые повреждения колеоптилей и почти на 20 % снижала жизнеспособность колеоптилей, которые не подвергались действию гипертермии (рис. 1). При этом выживание не подвергнутого нагреву колеоптилей в контроле и вариантах с НПН в концентрациях 0,02-2 мМ составляло не менее 95%.

На клетках листьев табака показано, что оксид азота, в зависимости от концентрации, способен как подавлять, так и активировать апоптозоподобную гибель клеток (Дубовская и др., 2007). На культуре клеток сои получены данные о том, что NO задействован в формировании реакции сверхчувствительности и программируемой клеточной гибели (апоптоза) при заражении бактериальным патогеном *Pseudomonas syringae* (Cevahir et al., 2007). Известно, что после определенного времени (приблизительно на 6-8-е сут проращивания проростков пшеницы при температуре 26°C) возможна гибель клеток колеоптилей по сценарию апоптоза, сопровождающаяся фрагментацией ДНК (Ванюшин, 2001; Замятина и др., 2003). В связи с этим для оценки адекватности изолированных колеоптилей как модели для исследования эффектов оксида азота определяли состояние ДНК в отрезках колеоптилей контрольного варианта и обработанных донором NO.

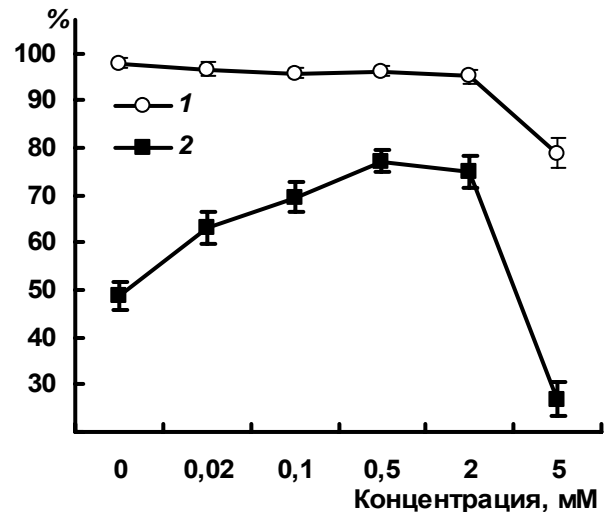


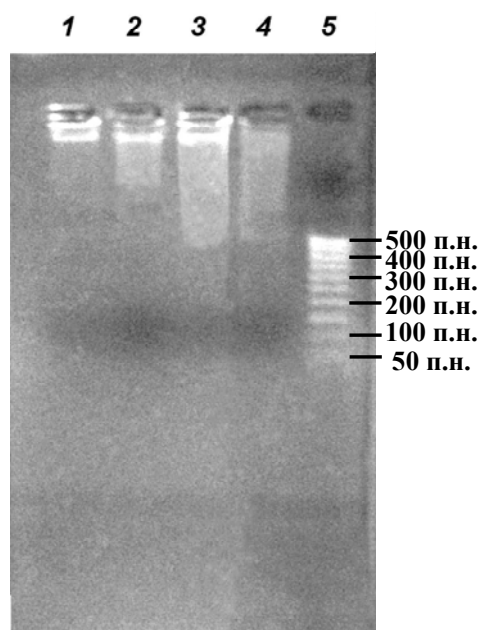
Рис. 1. Концентрационная зависимость влияния экзогенного НПН на выживание колеоптилей пшеницы (%).

1 – без нагрева; 2 – после повреждающего нагрева (43°C, 10 мин).

Электрофоретический анализ показал отсутствие фрагментации ДНК в колеоптилях контрольного варианта (пробы брали на 7 сут после начала проращивания семян, соответственно на третьи сутки инкубации изолированных колеоптилей). Не было выявлено заметных признаков фрагментации ДНК и в варианте с обработкой НПН в низкой концентрации (0,5 мМ). Через сутки после обработки колеоптилей НПН в высокой концентрации (5 мМ) наблюдались признаки фрагментации ДНК (рис. 2).

Для сравнения оценивали состояние ДНК колеоптилей, отделяемых от интактных 7-суточных проростков пшеницы. В отличие от частей колеоптилей, отделенных от 4-суточных проростков, в отрезках колеоптилей пшеницы, отпрепарированных от 7-суточных проростков, проявлялись явные признаки фрагментации ДНК (рис. 2).

Признаком повреждения мембран клеток колеоптилей, сопровождающего апоптоз, является их окрашивание красителем Эвансом голубым (Kawai, Uchimiya, 2000). Как показали наши исследования, у колеоптилей контрольного варианта, отделенных от проростков через 4 сут и затем 3 сут инкубировавшихся на растворе сахарозы, окрашивались только механически поврежденные торцы (рис. 3). Не наблюдалось окрашивания колеоптилей и в варианте с обработкой 0,5 мМ НПН. При действии НПН в концентрации 5 мМ отмечалось частичное



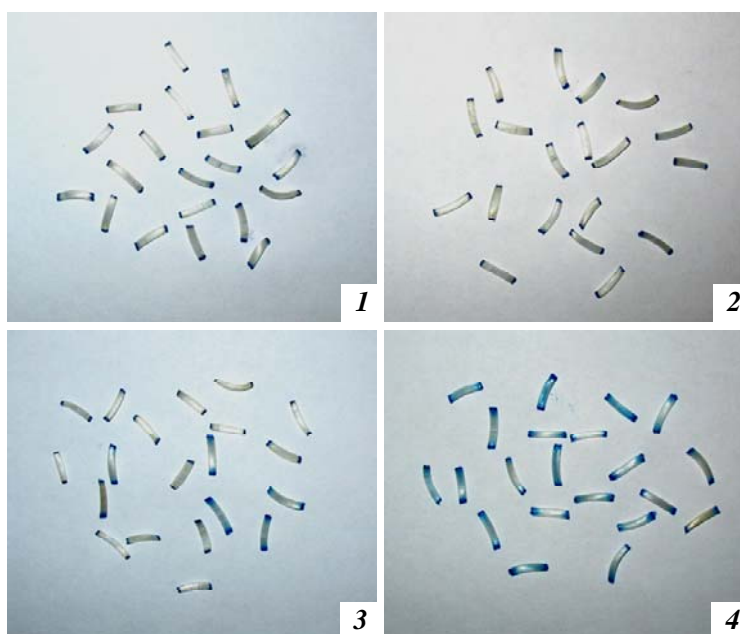
**Рис. 2. Электрофореграмма суммарной ДНК колеоптилей пшеницы.**

1 – контроль (изолированные колеоптили, отделенные от 4 суточных проростков и инкубированные 3 сут на 2% сахарозе); 2, 3 – то же с обработкой раствором с добавлением НПН в концентрации 0,5 и 5 мМ соответственно; 4 – колеоптили, отделенные от 7 суточных проростков; 5 – маркеры молекулярной массы ДНК.

окрашивание незначительного количества колеоптилей. Все колеоптили, которые отделялись от проростков через 7 сут проращивания, поглощали краситель (рис. 3), что свидетельствует о повреждении части их клеток.

Таким образом, данные экспериментов по окрашиванию колеоптилей Эвансом голубым согласуются с результатами оценки состояния ДНК (см. рис. 2), а также с визуальной оценкой выживания колеоптилей (см. рис. 1). В связи с этим имеются основания считать, что части колеоптилей, отделенные от проростков на четвертые сутки от начала проращивания при температуре 20°C, являются адекватной моделью для изучения действия различных экзогенных физиологических эффекторов (Мелехов и др., 1983), поскольку не проявляют признаков клеточной гибели. В наших экспериментах изолированные колеоптили, не подвергнутые действию стрессоров, полностью сохраняли жизнеспособность по крайней мере в течение 9 дней (см. рис. 1).

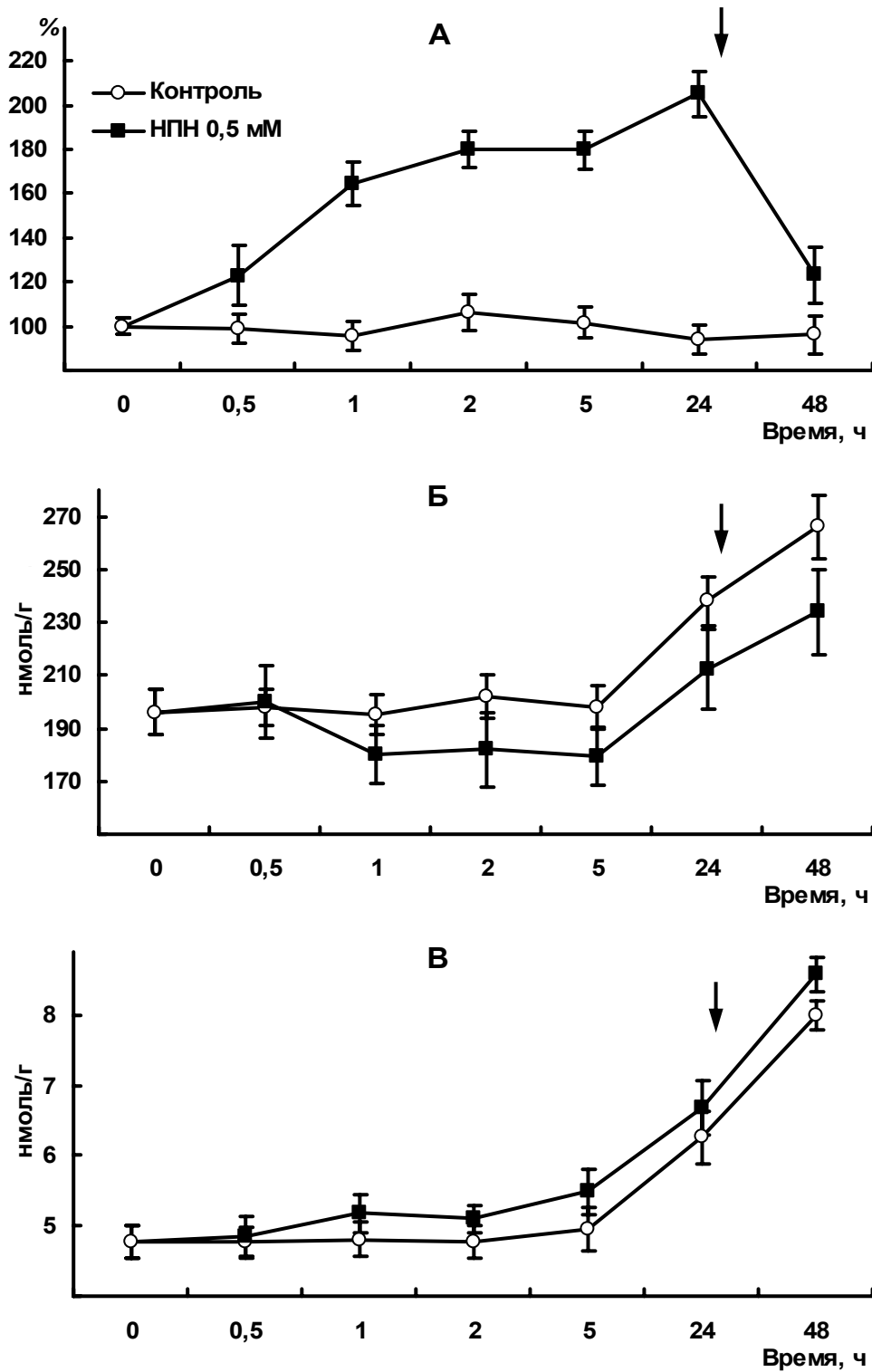
В последующих сериях экспериментов изучали влияние донора оксида азота на показатели, характеризующие образование АФК в колеоптилях пшеницы.



**Рис. 3. Окрашивание колеоптилей пшеницы Эвансом голубым.**

1 – контроль (изолированные колеоптили, отделенные от 4 суточных проростков и инкубированные 3 сут на 2% сахарозе); 2, 3 – то же с обработкой раствором с добавлением НПН в концентрации 0,5 и 5 мМ соответственно; 4 – колеоптили, отделенные от 7 суточных проростков.

### ИНДУЦИРОВАНИЕ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ



**Рис. 4.** Динамика генерации колеоптилями пшеницы супероксидного анион-радикала (А), содержания в них пероксида водорода (Б) и ТБК-активных продуктов (В) после начала обработки НПН.

1 – контроль (2% сахараза); 2 – 2% сахараза + НПН (0,5 мМ).

Стрелкой отмечен момент переноса колеоптилей опытного варианта на среду без НПН.

В отрезках колеоптилей контрольного варианта в течение всего периода наблюдений не отмечалось существенных изменений образования супероксида (рис. 4, А). В то же время

уже через 0,5 ч после введения НПН в среду инкубации колеоптилей происходило усиление генерации ими супероксидного анион-радикала. Значительно повышенный по сравнению с

контролем уровень генерации  $O_2^-$  наблюдался в течение всего 24 часового периода инкубации колеоптилей на среде с донором NO (рис. 4, А). Через 24 ч после переноса колеоптилей на среду без донора оксида азота (48 ч от начала наблюдений) генерация супероксида заметно уменьшалась, приближаясь к значениям контрольного варианта.

Обработка НПН вызывала небольшое снижение содержания пероксидов в колеоптилях пшеницы, такая тенденция была заметна через 1-24 ч после начала воздействия донора оксида азота (рис. 4, Б). Через 24-48 ч от начала наблюдений содержание пероксидов в колеоптилях контрольного варианта увеличивалось, что может быть связано с возрастными изменениями в тканях колеоптилей. При этом через 24 ч после переноса колеоптилей на среду, не содержащую НПН, содержание пероксидов в них было ниже, чем в соответствующем контрольном варианте (достоверно при  $p \leq 0,1$ ).

Под действием НПН наблюдалась тенденция к незначительному увеличению содержания ТБК-активных продуктов ПОЛ в течение всего периода наблюдений (рис. 4, В). Следует отметить достоверное повышение содержания продуктов ПОЛ через 24-48 ч от начала наблюдений в образцах как опытного, так и контрольного вариантов, что, как и увеличение содержания пероксидов, может быть обусловлено возрастными изменениями колеоптилей.

Как свидетельствуют полученные результаты (рис. 4), наиболее выразительным показателем изменения оксидантно-антиоксидантного равновесия в колеоптилях пшеницы, индуцируемого донором оксида азота, оказалась генерация супероксидного анион-радикала. В связи с этим в специальных сериях экспериментов исследовали влияние сквенжера NO метиленового синего, антиоксиданта ионола, блокатора кальциевых каналов хлорида лантана и антагониста кальмодулина хлорпромазина на эффект усиления образования  $O_2^-$ , вызываемый обработкой колеоптилей НПН. Концентрации названных модификаторов подбирали таким образом, чтобы они сами по себе не вызывали достоверных изменений показателя генерации супероксида (рис. 5) и не проявляли видимого токсического действия на колеоптили.

Характер влияния указанных эффекторов на образование супероксида в колеоптилях пшеницы через 2 и 24 ч после начала их обработки НПН был идентичным (рис. 5). Сквенжер оксида азота метиленовый синий в низкой концентрации (5 мкМ) на 65-70% снимал усиление генерации супероксида, вызываемое действием НПН, что свидетельствует о специфическом влиянии оксида азота, а не НПН как соли на образование  $O_2^-$ . Антиоксидант ионол уменьшал вызываемое донором оксида азота усиление генерации супероксидного анион-радикала приблизительно на 60%. Блокатор кальциевых каналов  $LaCl_3$  на 65-75% снимал

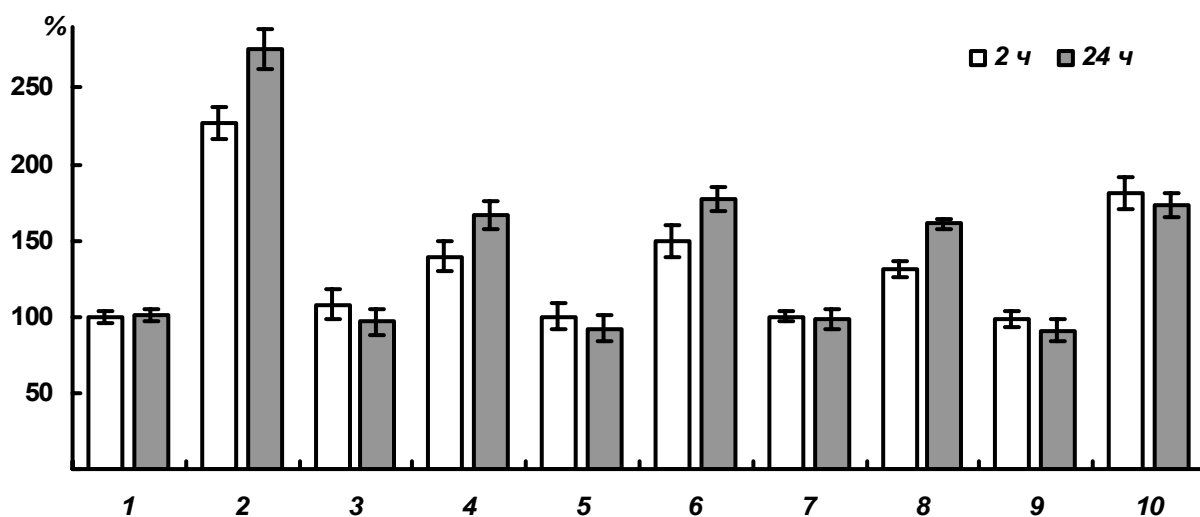
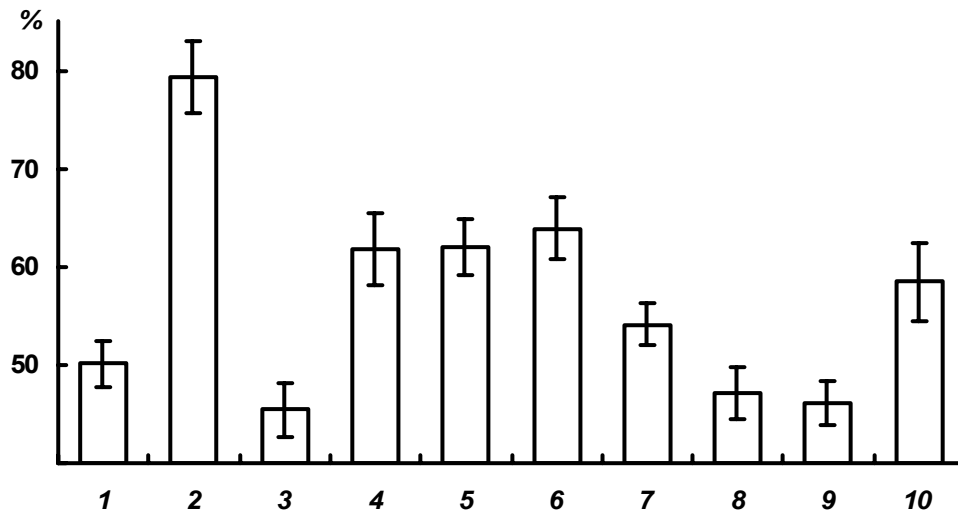


Рис. 5. Генерация супероксидного радикала колеоптилями пшеницы (% к контролю в начале эксперимента).

Здесь и на рис. 6: 1 – контроль (2% сахароза); 2 – 2% сахароза + НПН (0,5 мМ); 3 – 2% сахароза + метиленовый синий (5 мкМ); 4 – 2% сахароза + НПН (0,5 мМ) + метиленовый синий (5 мкМ); 5 – 2% сахароза + ионол (5 мкМ); 6 – 2% сахароза + НПН (0,5 мМ) + ионол (5 мкМ); 7 – 2% сахароза +  $LaCl_3$  (0,4 мМ); 8 – 2% сахароза + НПН (0,5 мМ) +  $LaCl_3$  (0,4 мМ); 9 – 2% сахароза + хлорпромазин (5 мкМ); 10 – 2% сахароза + НПН (0,5 мМ) + хлорпромазин (5 мкМ).

## ИНДУЦИРОВАНИЕ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ



**Рис. 6. Выживание (%) coleoptилей пшеницы после повреждающего нагрева (43°C, 10 мин).**

Обозначения как на рис. 5.

влияние донора оксида азота на генерацию супероксида. Менее существенным, но достоверным был эффект антагониста кальмодулина. Хлорпромазин на разных фазах эксперимента уменьшал вызываемое обработкой НПН усиление генерации супероксида coleoptилями на 35-55%. Таким образом, можно полагать, что усиление генерации супероксида в coleoptилях пшеницы, вызываемое экзогенным оксидом азота, является кальцийзависимым.

Обработка coleoptилей метиленовым синим, хлоридом лантана и хлорпромазином в указанных концентрациях сама по себе не вызвала достоверных изменений теплоустойчивости coleoptилей пшеницы (рис. 6). В то же время все названные модификаторы достоверно уменьшали положительное действие донора оксида азота на теплоустойчивость coleoptилей. Ионол сам по себе вызывал небольшое повышение процента выживания отрезков, что может быть связано с его прямым антиоксидантным действием, при этом антиоксидант в значительной степени нивелировал увеличение теплоустойчивости coleoptилей, вызываемое их обработкой донором оксида азота (рис. 6).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наши эксперименты, обработка coleoptилей пшеницы донором оксида азота вызывала значительное усиление генерации ими «внешнего» супероксида, влияние экзогенного NO на содержание пероксидов и ТБК-активных продуктов ПОЛ было менее су-

щественным (см. рис. 4). Некоторое снижение содержания пероксида водорода в coleoptилях пшеницы после обработки coleoptилей НПН может быть связано с расходом пероксидов на процесс ПОЛ, проявления которого под влиянием обработки coleoptилей донором оксида азота несколько усиливались. Уменьшение количества  $H_2O_2$  под влиянием обработки coleoptилей донором NO также может быть связано с активацией антиоксидантных ферментов (Tewari et al., 2008). Эффект усиления генерации супероксида был обратимым (практически полностью нивелировался после прекращения инкубации coleoptилей на растворе донора оксида азота).

Известно, что АФК, в т.ч. супероксидный анион-радикал и пероксид водорода, при определенных условиях могут вызывать фрагментацию ДНК и выступать индукторами клеточной гибели (Ванюшин, 2001; Suzuki, Mittler, 2006). В то же время в условиях наших экспериментов усиление генерации супероксида, вызываемое действием донора оксида азота в низкой концентрации (0,5 мМ), не сопровождалось фрагментацией ДНК и не отражалось на жизнеспособности coleoptилей (см. рис. 1-4). Более того, после обработки НПН значительно повышалась теплоустойчивость coleoptилей пшеницы (см. рис. 1 и 6).

По-видимому, фрагментация ДНК (см. рис. 2) и повреждения мембран, выявляемые по окрашиванию coleoptилей Эвансом голубым (см. рис. 3), более выражены при старении coleoptилей в составе интактных проростков. Не



исключено, что отделение колеоптиля от проростка исключает поступление в колеоптиль сигнала, стимулирующего программируемую клеточную гибель. В связи с этим колеоптиль, отделенные от проростков по крайней мере на четвертые сутки их прорастивания, в отличие от таковых в составе интактных проростков, можно рассматривать как адекватную модельную систему для изучения клеточных механизмов устойчивости к действию стрессоров.

Для выяснения причин вызываемого донором оксида азота усиления генерации супероксидного радикала колеоптилями пшеницы (см. рис. 4, А) необходимы специальные исследования. Весьма вероятным механизмом такого эффекта может быть повышение активности НАДФН-оксидазы, которая является одним из основных генераторов супероксида клеточной поверхностью (Глянько и др., 2009). Показано увеличение активности этого фермента и усиление генерации супероксидного анион-радикала в культуре тканей корней женьшеня под влиянием нитропруссид натрия (Tewari et al., 2008).

В наших экспериментах установлено, что усиление генерации  $O_2^-$  в значительной степени угнеталось блокаторм кальциевых каналов лантаном и в меньшей степени антагонистом кальциемодулина хлорпромазином (см. рис. 5). Кальцию принадлежит важная роль в регуляции активности НАДФН-оксидазы. Согласно одной из моделей, этот фермент активируется после увеличения концентрации цитозольного кальция и повышения активности  $Ca^{2+}$ -зависимой протеинкиназы, которая фосфорилирует N-терминальный участок в молекуле НАДФН-оксидазы (Wong et al., 2007). Имеются сведения и о возможности прямой активации НАДФН-оксидазы ионами кальция (Sagi, Fluhr, 2001). Известно, что субъединица 91 кД НАДФН-оксидазы имеет два  $Ca^{2+}$ -связывающих сайта (Keller et al., 1998). Несмотря на то, что механизмы участия кальция в регуляции активности НАДФН-оксидазы растений выяснены не полностью, уже не вызывает сомнения, что кальций является неотъемлемым компонентом НАДФН-оксидазной ферментативной системы (Глянько и др., 2009).

Наблюдаемое нами частичное снятие антагонистом кальциемодулина эффекта усиления генерации супероксидного радикала, вызываемого обработкой колеоптилей донором оксида азота, можно рассматривать как косвенное свидетельство достаточно сложного (непрямого)

влияния кальция на активность ферментативных систем, генерирующих супероксид. Следует заметить, что наряду с НАДФН-оксидазой в генерации супероксидного радикала может принимать участие внеклеточная пероксидаза, которая также является кальцийзависимым ферментом (Kawano, Muto, 2000).

Усиление генерации супероксида, вызываемое донором оксида азота, по-видимому, следует рассматривать как реакцию, причастную к индуцированию теплоустойчивости действием NO. Так, обработка колеоптилей пшеницы антиоксидантом ионолом (скавенджер супероксида) не только уменьшала эффект усиления генерации  $O_2^-$ , но и нивелировала повышение теплоустойчивости колеоптилей, вызываемое действием донора оксида азота (см. рис. 5, б). Подобное влияние на индуцирование теплоустойчивости колеоптилей оксидом азота оказывали и антагонисты кальция, снижающие эффект усиления образования супероксидного анион-радикала.

Вполне вероятно, что повышение теплоустойчивости колеоптилей, вызываемое действием оксида азота, связано с активацией антиоксидантных ферментов. Так, в культуре корней женьшеня при обработке донором NO, наряду с усилением генерации супероксидного радикала, отмечалось повышение активности супероксиддисмутазы, каталазы и аскорбатпероксидазы (Tewari et al., 2008).

В целом, можно констатировать, что обработка колеоптилей пшеницы донором оксида азота активировала защитные реакции, необходимые для развития теплоустойчивости. Такая активация происходила при посредничестве АФК и ионов кальция. Для усиления генерации АФК под действием NO, по-видимому, требуется предварительное повышение концентрации цитозольного кальция. В пользу этого предположения свидетельствует частичное снятие вызываемого донором оксида азота эффекта усиления генерации супероксида колеоптилями при обработке их антагонистами кальция (см. рис. 5). В то же время вполне вероятно и усиление поступления кальция в клетки под влиянием АФК (Logan, Knight, 2003; Kwak et al., 2006). Схематически участие АФК и ионов кальция в реализации действия экзогенного оксида азота представлено на рис. 7. Заметим, что полученные нами экспериментальные данные недостаточны для установления причинно-следственных связей между ионами кальция и АФК как посредниками, задействованными в

## ИНДУЦИРОВАНИЕ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ

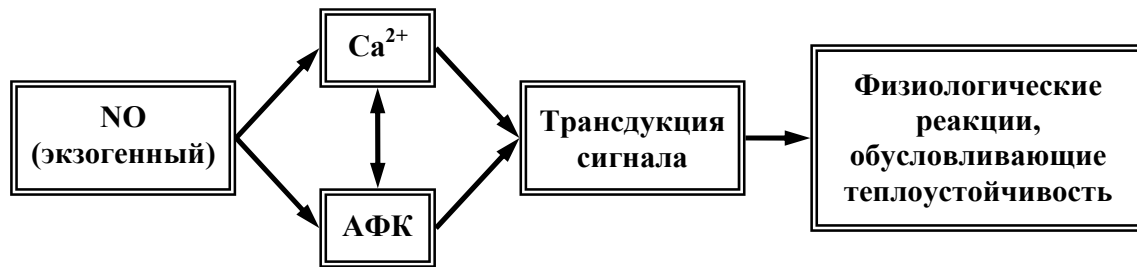


Рис. 7. Возможная связь оксида азота с другими сигнальными интермедиатами при индуцировании теплоустойчивости coleoptилей.

реализации эффектов экзогенного оксида азота. Выяснению таких связей в дальнейшем могло бы способствовать синхронное определение концентрации кальция и содержания АФК в клетках в реальном времени. В то же время, независимо от характера связей между кальцием и АФК, можно утверждать, что данные сигнальные интермедиаты необходимы для индуцирования оксидом азота реакций, способствующих развитию теплоустойчивости coleoptилей пшеницы. Об этом свидетельствует нивелирование эффектов донора NO как предварительной обработкой coleoptилей антиоксидантом, так и антагонистами кальция.

### ЛИТЕРАТУРА

- Бояришинов А.В., Картунова Ю.Е., Асафова Е.В., Хохлова Л.П. Цитоскелет-зависимые влияния нитропруссид натрия на содержание  $H_2O_2$  и активность аскорбатпероксидазы в корнях трех сортов яровой пшеницы // Уч. записки Казанского гос. ун-та. Естеств. науки. – 2008. – Т. 150, кн. 2. – С. 91-100.
- Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у растений // Успехи биол. химии. – 2001. – Т. 41. – С. 3-38.
- Глянько А.К., Васильева Г.Г. Особенности действия активных форм кислорода и азота при бобово-ризобияльном симбиозе // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2007. – Вип. 3 (12). – С. 27-41.
- Глянько А.К., Ищенко А.А., Митанова Н.Б., Васильева Г.Г. НАДФН-оксидаза растений // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2009. – Вип. 2 (17). – С. 6-18.
- Дубовская Л.В., Колеснева Е.В., Князев Д.М., Вологовский И.Д. Защитная роль оксида азота при окислительном стрессе, индуцированном в растениях табака пероксидом водорода // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 6. – С. 847-855.
- Емец А.И., Красиленко Ю.А., Шермет Я.А., Блюм Я.Б. Реорганизация микротрубочек как ответ на реализацию сигнальных каскадов оксида азота (II) в растительной клетке // Цитология и генетика. – 2009. – Т. 43, № 1. – С. 3-10.
- Замятина В.А., Бакеева Л.Е., Александрушкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у этиолированных проростков пшеницы. 2. Влияние антиоксиданта (ВНТ) и перекисей // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 2. – С. 280-290.
- Колупаев Ю.Е., Акинина Г.Е., Мокроусов А.В. Индукция теплоустойчивости coleoptилей пшеницы ионами кальция и ее связь с окислительным стрессом // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 2. – С. 227-232.
- Мелехов Е. И., Рамазанова Л. Х., Васильева А. В. и др. Методы количественной оценки поврежденных и их модификации // Изв. АН СССР. Сер. биологическая. – 1983. – №3. – С.785-788.
- Мерзляк М.Н., Погосян С.И., Юферова С.Г., Шевырева В.А. Использование 2-тиобарбитуровой кислоты при исследовании перекисления липидов в тканях растений // Биол. науки. – 1978. – № 9. – С. 86-94.
- Тян С.Р., Лей Ю.Б. Физиологические ответные реакции проростков пшеницы на засуху и облучение УФ-Б. Влияние нитропруссид натрия // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 5. – С. 763-769.
- Шорнинг Б.Ю., Смирнова Е.Г., Ягузинский Л.С., Ванюшин Б.Ф. Необходимость образования супероксида для развития этиолированных проростков пшеницы // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 12. – С. 1612-1618.
- Cevahir G., Aytamka E., Elor G. The role of nitric oxide in plants // Biotechnol. & Biotechnol. EQ. – 2007. – V. 21, № 1. – P. 13-17.
- Courtois C., Besson A., Dehan J. et al. Nitric oxide signalling in plants: interplays with  $Ca^{2+}$  and protein kinases // J. Exp. Bot. – 2008. – V. 59. – P. 155-163.
- Delledonne M., Jurgen Z., Adriano M., Lamb C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98. – P. 13454-13459.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. // Phytochem. Bull. – 1987. – V. 19. – P. 11-15.

- Jih P.C., Chen Y.C., Jeng S.T.* Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in expressions of the impomolin gene from sweet potato // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 132. – P. 381-389.
- Kawai M., Uchimiya H.* Coleoptile senescence in Rice (*Oryza sativa* L.) // *Ann. Bot.* – 2000. – V. 86. – P. 405-414.
- Kawano T., Muto S.* Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture // *J. Exp. Bot.* – 2000. – V. 51. – P. 685-693.
- Keller T., Damude H.G., Verner D. et al.* A plant homologue of the neutropil NADPH oxidase gp91 phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>++</sup> binding motifs // *Plant Cell.* – 1998. – V. 10. – P. 255-266.
- Klessig D.F., Durner J., Noad R. et al.* Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97. – P. 8849-8855.
- Kwak J.M., Nguyen V., Schroeder J.I.* The role of reactive oxygen species in hormonal responses // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141. – P. 323-329.
- Lamotte O., Courtois C., Dobrowolska G. et al.* Mechanisms of nitric oxide-induced increase of free cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in *Nicotiana glauca* cells // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2006. – V. 40. – P. 1341-1351.
- Lammotte O., Guold K., Lecourenux D. et al.* Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 135. – P. 516-529.
- Logan D.C., Knight M.R.* Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 133. – P. 21-24.
- Lu D., Zhang X., Jiang J. et al.* NO may functionate in pathway of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decrease for ABA induced stoma closure in *Vicia faba* // *J. Plant Physiol. and Mol. Biol.* – 2005. – V. 31, № 1. – P. 62-70.
- Neill S., Bright J., Desikan R. et al.* Nitric oxide evolution and perception // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59. – P. 25-35.
- Sagi M., Fluhr R.* Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase: modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection // *Plant Physiol.* – 2001. – V. 126. – P. 1281-1290.
- Sagisaka S.* The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // *Plant Physiol.* – 1976. – V. 57. – P. 308-309.
- Simpson G.G.* NO in flowering // *Bioessays.* – 2005. – V. 27. – P. 239-324.
- Suzuki N., Mittler R.* Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // *Physiol. Plant.* – 2006. – V. 126. – P. 45-51.
- Tewari R.K., Hahn E.-J., Paek K.-Y.* Function of nitric oxide and superoxide anion in the adventitious root development and antioxidant defence in *Panax ginseng* // *Plant Cell Rep.* – 2008. – V. 27. – P. 563-573.
- Uchida A., Jagendorf A. T., Hibino T. et al.* Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice // *Plant Sci.* – 2002. – V. 163, № 3. – P. 515-523.
- Vandelle E., Poinssot B., Wendehenne D. et al.* Integrated signalling network involving calcium, nitric oxide, active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses // *Molecular Plant-Microbe Interactions.* – 2006. – V. 19. – P. 429-440.
- Wilson I.D., Neill S.J., Hancock J.T. et al.* Nitric oxide synthesis and signalling in plants // *Plant Cell Environ.* – 2008. – V. 31. – P. 622-631.
- Wong H.L., Pinontoan R., Hayashi K. et al.* Regulation of rice NADPH oxidase by Rac GTPase to its N-terminal extension // *Plant Cell.* – 2007. – V. 19, № 12. – P. 4022-4034.
- Xing H., Tan L., An L. et al.* Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss // *Plant Growth Regul.* – 2004. – V. 42, № 1. – P. 61-68.
- Xu M., Dong J., Zhang M.* Signal interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide in heat shock-induced hypericin production of *Hypericum perforatum* suspension cells // *Sci. in China. Ser. C: Life Sci.* – 2008. – V. 51, № 8. – P. 676-686.
- Zhang L., Zhou S., Xuan Y., Sun M.* Protective effect of nitric oxide against oxidative damage in *Arabidopsis* leaves under Ultraviolet-B Irradiation // *J. Plant Biol.* – 2009. – V. 52. – P. 135-140.
- Zhang Y., Wang L., Liu Y et al.* Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in the tonoplast // *Planta.* – 2006. – V. 224. – P. 545-555.
- Zhao M.-G., Tian Q.-Y., Zhang W.-H.* Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2007. – V. 144. – P. 206-217.

Поступила в редакцию  
10.02.2010 г.

## **ИНДУЦИРОВАНИЕ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ**

### **INDUCTION OF HEAT RESISTANCE OF WHEAT COLEOPTILES BY ACTION OF NITRIC OXIDE DONOR: CROSSTALK OF NO AND OTHER SIGNALING MESSENGERS**

Yu. V. Karpets, Yu. Ye. Kolupaev, T. O. Yastreba, G. Ye. Akinina,  
V. M. Popov, M. V. Shvidenko, A. O. Vayner, G. P. Kots, O. I. Oboznyi

*V.V.Dokuchayev Kharkiv National Agrarian University  
(Kharkiv, Ukraine)*

The influence of nitric oxide donor sodium nitroprusside (SNP) on the resistance of wheat coleoptiles to the damaging heating (action of temperature 43°C during 10 minutes) have been studied. Treatment of coleoptiles with SNP led to the significant intensifying of superoxide generation, caused the tendency to decrease of hydrogen peroxide content and to increase of content of lipid peroxidation products in them. Inducing the effect of oxidative stress, the influence of nitric oxide donor in concentration 0,5 mM at the same time did not cause the fragmentation of DNA and the sign of loss of membrane integrity identified by staining with Evans blue. At that the treatment of wheat coleoptiles with SNP in concentration 0,1-2 mM led to the increase of their resistance to hyperthermia. Nitric oxide scavenger methylene blue, antioxidant ionol, calcium channels blocker lanthanum chloride and calmodulin antagonist chlorpromazine substantially reduced the intensifying of superoxide generation, induced by coleoptiles treatment with SNP. Thus, all the named modifiers reduced effect of increase of heat resistance of wheat coleoptiles, caused by the influence of nitric oxide donor. The conclusion is made that the induction of heat resistance of coleoptiles at the action of exogenous NO took place at intermediary of reactive oxygen species and calcium ions as endocellular messengers.

**Key words:** *Triticum aestivum L., nitric oxide (NO), reactive oxygen species, calcium, heat resistance*

### **ИНДУКУВАННЯ ТЕПЛОСТІЙКОСТІ КОЛЕОПТИЛІВ ПШЕНИЦІ ДІЄЮ ДОНОРА ОКСИДУ АЗОТУ: ЗВ'ЯЗОК NO З ІНШИМИ СИГНАЛЬНИМИ МЕСЕНДЖЕРАМИ**

Ю. В. Карпець, Ю. Є. Колупаєв, Т. О. Ястреб, Г. Є. Акініна,  
В. М. Попов, М. В. Швиденко, А. О. Вайнер, Г. П. Коц, О. І. Обозний

*Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва  
(Харків, Україна)*

Вивчали вплив донора оксиду азоту нітропрусида натрію (НПН) на стійкість колеоптилів пшениці до ушкоджувального нагрівання (10-хвилинна дія температури 43°C). Обробка колеоптилів НПН призводила до значного посилення генерації ними супероксидного аніон-радикала, зниження в них вмісту пероксиду водню і деякого збільшення кількості продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Дія донора оксиду азоту в концентрації 0,5 мМ, індукуючи ефект окислювального стресу, в той же час не спричиняла фрагментації ДНК і ознак втрати цілісності мембран, що виявлялася за забарвленням Евансом блакитним. При цьому обробка колеоптилів пшениці НПН в концентраціях 0,1-2 мМ призводила до підвищення їх стійкості до гіпертермії. Скавенжер оксиду азоту метиленовий синій, антиоксидант іонол, блокатор кальцієвих каналів хлорид лантану і антагоніст кальмодуліну хлорпромазин значною мірою зменшували посилення генерації супероксиду, індуковане обробкою колеоптилів НПН. При цьому всі названі модифікатори знижували ефект підвищення теплостійкості колеоптилів пшениці, спричинюваний дією донора оксиду азоту. Зроблено висновок про те, що індукування теплостійкості колеоптилів за дії екзогенного NO відбувалося за посередництва активних форм кисню та іонів кальцію як внутрішньоклітинних месенджерів.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum L., оксид азоту (NO), активні форми кисню, кальцій, теплостійкість*